

## 3'-Me-DAB によるラット肝癌形成過程の研究

——前癌期および発癌期における  $\alpha$ -Fetoprotein  
産生細胞と肝の組織像との関連——

本谷 信 伝法公麿 森 道夫

札幌医科大学病理学第2講座 (主任 小野江為則 教授)

### Immunohistochemical Study on $\alpha$ -Fetoprotein-Producing Cells in the Liver of Rats during Hepatocarcinogenesis by 3'-Me-DAB

—— In Association with Histological Changes in the Liver ——

Makoto MOTOYA, Kimimaro DEMPO and Michio MORI

*Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College*

*(Chief: Prof. T. Ono)*

Immunohistochemical investigations of  $\alpha$ -fetoprotein (AFP)-producing cells during the course of hepatocarcinogenesis in rats fed 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-Me-DAB) were carried out in an attempt to elucidate the relationship between AFP production and histological changes in the liver.

The course of hepatocarcinogenesis is divided into 3 stages based on the levels of AFP in the sera. The first of these stages, that of transient elevation of serum AFP, occurs 3 to 6 weeks after azo-dye feeding. AFP at this stage is demonstrated in the transitional hepatocytes and small hepatocytes which are seen among proliferated oval cells. The second stage corresponds to the period from 6 to 16 weeks after azo-dye feeding during which time the serum AFP level is very low. At this stage, a number of precancerous lesions (hyperplastic foci and hyperplastic nodules) are observed in the hepatic tissue. No AFP-producing cells were detected within these lesions in the present study. AFP was positively shown in some of the hyperbasophilic foci, but the significance of the hyperbasophilic foci in the development of liver cancer was not clarified. The third stage corresponds to the period after 16 weeks of 3'-Me-DAB feeding. AFP reappeared in the sera of the rats, and liver cancers developed in the liver. AFP was detected mainly in the cancer cells with a poorly differentiated carcinoma pattern, and occasionally in the cancer cells with a trabecular carcinoma pattern. On the other hand, AFP was rarely seen in cancer cells with an adenocarcinoma pattern.

In relation to AFP-producing cells, the process of 3'-Me-DAB hepatocarcinogenesis in rats was briefly discussed.

(Received January 26, 1982 and accepted February 8, 1982)

## 1 緒 言

$\alpha$ -fetoprotein (以下 AFP) は, 1963 年 Abelev et al.<sup>1)</sup> により肝癌の移植を受けたマウスの血中出现することが見出された。その後, この蛋白が肝癌患者の血中にも出現することが Tatarinov<sup>2)</sup> によって観察され, 肝癌の血清診断の有力な手段として広く臨床に応用されるようになった。

AFP は, 成熟個体のアルブミンに相当する胎児期の血漿蛋白であり, そのアミノ酸の配列および高次構造

もアルブミンと類似することが明らかにされている<sup>3)</sup>。ラットにおける個体発生の過程で観察すると, 胎児期で高値を示した AFP は生後次第に低下し, これに代わってアルブミンが増加し, 生後3週以降は成熟個体と同様に, アルブミンが血漿蛋白の主体を占めるようになる<sup>4)</sup>。免疫組織化学によるラット肝の検索では, 胎児期にはすべての肝細胞が AFP を産生しているが, 生後次第に小葉周辺部からアルブミンだけを産生するようになり, 生後3週以降では, AFP 産生細胞は全く認められなくなることが示されている<sup>5)</sup>。

このように AFP の産生は、肝細胞の最も基本的な機能である血漿蛋白の産生における胎児期形質の発現としてとらえられるから、実験肝癌の形成にともなう肝細胞の脱分化のマーカーとしても応用されるものと考えられる。そこで本研究では、3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-Me-DAB) によるラット肝癌発生過程における肝の組織像の変化と AFP 産生細胞の関係について検討を加えた。なお、3'-Me-DAB 投与初期におけるラット肝の AFP 産生細胞については、すでに Onoé et al<sup>6)</sup>, Dempo et al<sup>7)</sup>, 佐々木ら<sup>5)</sup>によって詳細な報告がなされているので、今回は 3'-Me-DAB 投与 6 週以降の前癌期および発癌期における肝の組織学的変化と AFP 産生細胞の関係、および形成された肝癌の組織像と AFP 産生細胞についての検討を行った。

## 2 実験方法

### 2.1 実験動物および実験方法

体重 150~170 g のウィスター系雄ラットに 3'-Me-DAB (東京化成, 東京) を 0.06% の割合で混入した固型飼料 (オリエンタル酵母社, 東京) を任意に摂取させた。65 匹の動物を次の 2 群に分けた。

第 1 群: 前癌期の検索のために、3'-Me-DAB 投与 6 週から 12 週まで毎週 3 匹ずつの動物をエーテル麻酔のもとで頸静脈より放血、屠殺した。血清採取のための採血したあとで肝組織をとり出した。また 12 週間 3'-Me-DAB 食を与えたあと、アゾ色素をのぞいた基礎食にもどして、2, 4, 6, 8 週後の動物についても同様に血液および肝組織を採取した。

第 2 群: 肝癌の検索のために 18 週間ないし 23 週間、3'-Me-DAB を投与し続けた動物について、同様に血液と肝組織の採取を行った。

血中の AFP 出現については、各動物ごとの血清を用いて、micro-Ouchterlony 法で確認した。また肝組織から、最大割面をふくむ厚さ 2-3 mm の組織片を切り出し、冷アセトンで固定した。脱水後、ベンゼンで透徹して、軟パラフィン (融点 52~54°C) に包埋し、免疫組織化学的な AFP 産生細胞の検出に供した。残りの肝組織をカルノア液で固定し、通常パラフィンに包埋して、HE 染色、PAS 染色などの組織学的検索を行った。

### 2.2 免疫組織化学の方法

アセトン固定、軟パラフィン包埋の材料から 6  $\mu$ m の切片を作製し、第 1 群の組織については Nakane and Pierce<sup>8)</sup> のペルオキシダーゼ抗体法間接法で AFP 産生細胞を検索した。切片を脱パラフィン後、まず室温の

0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノール液に 30 分間浸漬して内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化した。ついて抗ラット AFP (家兎) 血清を第 1 次抗体として室温で 30 分間反応させ、第 2 次抗体としてペルオキシダーゼ抱合抗兎  $\gamma$ -グロブリン (山羊) 血清 (Cappel 社, U. S. A) を室温で 30 分間反応させたあと、3, 3'-diaminobenzidine で発色させた。第 2 群の組織は、Sternberger et al<sup>9)</sup> の PAP (peroxidase antiperoxidase) 法<sup>9)</sup>によって検索した。すなわち第 1 群と同じ方法で内因性ペルオキシダーゼを不活化したあと、第 1 次血清として抗ラット AFP (家兎) 血清、第 2 次血清として抗兎  $\gamma$ -グロブリン (山羊) 血清 (Miles 社, U. S. A)、第 3 次血清として PAP (家兎) 血清 (Dako 社, Denmark) を用い、それぞれ室温で 30 分間反応させたのち、3, 3'-diaminobenzidine で発色させた。切片はその後 0.2% メチルグリーンで核染色を施し、ビオライトで封入鏡検した。なお、対照として、抗ラット AFP 血清の代りに抗ラット  $\gamma$ -グロブリン (家兎) 血清 (Miles 社, U. S. A) を用い、特異性の確認を行った。すなわち、抗 AFP 抗体で染色された場合でも、 $\gamma$ -グロブリンが陽性であった場合は、血清成分の細胞内混入の可能性が強いので、その細胞は AFP 産生細胞と認めないことにした。

## 3 結 果

### 3.1 肉眼所見

3'-Me-DAB 投与 6 週目の肝は萎縮性で、肝縁は鋭くなっているが、8 週を過ぎるとその中にところどころ、直径数 mm の半球状の膨隆をみるようになった。10 週目で膨隆は明瞭となり、12 週目では多数のやや白色味を帯びた結節として認められるようになった。しかし、第 1 群の動物では 12 週間 3'-Me-DAB 投与後に正常食にもどすと、膨隆の数は減少し、外見上平坦になるものが多く、一部のものだけが結節として残存していた。

3'-Me-DAB を 18 週間ないし 23 週間投与した第 2 群では、白色の結節の出現が目立ち、結節の一部は出血を伴っていた。結節の中で出血と部分的な壊死を伴ったものは、肉眼的にも癌であることが推測された。癌の直径が 1 cm を超えるものでは、出血壊死に陥っているものが多かった。癌以外の肝組織 (非癌部) では、第 1 群のそれと同様の大小の膨隆がみられ、人の肝硬変の外観に類似する。これらの結節とは別に、多数の白色調の強い病巣がみられたが、表面が陥凹していることから、結節と区別された。触診上では極めて固く、こ

の点でも結節と異なった。割面では粘稠な粘液の産生をみた。これらは組織学的に adenofibrosis (cholangiofibrosis) に一致するものであった。

### 3・2 組織学的所見

第1群：3'-Me-DAB 投与後6週目の肝の組織学的所見は、基本的に Iwasaki et al.<sup>10)</sup> の記載と同様である。すなわち、正常の肝細胞索は全く乱れ、Glisson 鞘を中心とした小葉周辺部の肝細胞は消失しており、代わって小型で卵円形の核をもつ、いわゆる oval cell がこの部に増生している。これらの oval cell の間には、細胞質がやや好塩基性の小型の肝細胞が認められ、小葉の大部分を占めている。細胞質が豊富で好酸性を示し、巨大な核をもつ変性肝細胞は、小葉の中心部にわずかにとり残されて存在している (Photo 1A)。

3'-Me-DAB 投与8週目では大型の変性肝細胞はほとんど消失し、小葉には細胞質がやや豊富な小型肝細胞が大部分を占めるようになった。oval cell はかなり少数となった。3'-Me-DAB 9週をすぎると、肝小葉はほぼ完全に再生肝細胞に占められるようになった。この時期の肝では、小葉周辺部には細胞質がやや小さく、塩基好性を示す肝細胞が小集団を作っているのが見い出されることがあるが (Photo 2)、通常の HE 染色ではこれらの細胞巣を同定することは容易ではなかった。これらは千坂らの報告している  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase 陽性の増生巣 hyperplastic foci と呼ばれるものに相当する (千坂ら、札幌医誌印刷中)。

10週から12週では増生巣の数が増加するが、一方周囲の肝細胞を圧排性に増生する、いわゆる増生結節 hyperplastic nodule が多数みられるようになった (Photo 3)。増生結節を構成する細胞の核は、小型円形で明瞭な核小体をもっていた。細胞質の少ないもの、豊富なものが混在するが、細胞質の好塩基性は周囲の肝細胞より高いものが多かった。細胞は密に増生し1列性の索状配列はみられなかった。分裂像がしばしば認められた。周囲肝組織を圧排性に増生するので、小葉周辺部では正常肝細胞索との連続は認められなかった (Photo 4A)。

こうした増生結節とは別に、oval cell が隔壁状に増生しているために、これに取り囲まれた肝細胞が結節様にみえる場合があった。しかしこの場合には、肝細胞索は明瞭で、分裂像も認められないから増生結節と区別された (Photo 3)。これらは偽結節というべきものである。また小型で細胞質の少ない好塩基性の細胞よりなる増生巣をみることがあった (Photo 5A)。これらは Daoust and Molner<sup>11)</sup> のいう好塩基性増生巣

hyperbasophilic foci に一致するものである。好塩基性増生巣を構成する細胞には異型性は認められず、この点で癌と区別されるが、細胞分裂像は極めて多かった。

その他、肉眼的に白色で固い陥凹性の結節として認められたものは、不規則な腺腔を作る高円柱上皮細胞の増生と、その周囲の豊富な結合組織の増生をみる adenofibrosis である。円柱上皮の間には杯細胞も認められ、まれながら腸の吸収上皮細胞にみるような刷子縁を認める細胞も出現した。

3'-Me-DAB の投与を12週で中止し、以後正常食にもどすと、2~4週後には小葉周辺部の oval cell や偽結節は減少し、増生結節だけがみられるようになる。この中の一部に細胞質が乏しく、強い塩基好性を示し、充実に周囲肝組織を圧排性に増生するものがみられ、構成細胞の異型性から肝癌と診断された。

第2群：3'-Me-DAB 食を与え続けた23匹中の22匹 (95.6%) に組織学的に肝癌の形成をみた。アゾ色素肝癌の組織像は、小野江・布施<sup>12)</sup> が述べているように maximal deviation hepatoma というべきほど多彩である。<sup>12)</sup> 最近 Stewart らは実験肝癌の組織像を4型に分類しているが<sup>13)</sup> 今回検索した肝癌は、ほとんど4型の全てが不規則に混在するもので、癌結節が大きくなればなるほど、その多彩性が目立った (Photos 6A, 7A, 8A, 9A, 10, 11)。

非癌部には第1群でみられたと同様の多数の増生結節、偽結節と、少数の好塩基性増生巣が認められた。Glisson 鞘周辺には、oval cell の増生巣がみられた。

### 3・3 AFP 産生細胞の免疫組織学的所見

3'-Me-DAB 投与6週目の肝における AFP 産生細胞は、Dempo et al.<sup>7)</sup> 佐々木ら<sup>8)</sup> の報告に一致して、oval cell 増生周囲の移行型細胞および再生小型肝細胞の一部に陽性に認められた (Photo 1B)。これらの AFP 陽性細胞はいずれも細胞質に乏しく、かつ HE 染色で塩基好性を示すものであり、細胞質が豊富なものでは陰性であった。

10週以降の動物には、肝に多数の増生巣、増生結節および偽結節が認められた。特に第2群の肝には多数の結節性病変がみられたが、PAP 法という非常に感度の高い方法を用いたにもかかわらず、AFP 産生細胞はこれらの病巣中には発見し得なかった。 (Photo 4B) この傾向は、ペルオキシダーゼ抗体法を用いた第1群にも同様であった。しかし第1群の31匹中の4匹、第2群の23匹中の4匹に認められた好塩基性増生巣では、いずれもが AFP 陽性を示した。しかも増生巣を構成す

る細胞の1/3近くがAFP陽性であった(Photo 5B)。

第1群, 第2群とも肝癌形成をみた動物には血中AFPを高率に検出した。しかし第2群の23匹の動物において, 組織学的に観察された74個の癌のうちで, その切片上にAFP産生細胞のみられたものは32個だけであった。またAFP産生細胞のみられた癌組織の中でも陽性細胞の占める割合は低いものが多かった。AFP産生癌細胞の特徴は, いずれも細胞質に乏しく好塩基性を示すことで, 核は小型円形で, 明瞭な核小体をもつものであった。細胞質が豊富で, 好酸性を示す細胞や, 大型の癌細胞にはAFP産生はみられなかった。組織型ではAFP産生細胞は低分化癌型に多く(Photo 6B, 7B) 次いで索状型に散在性にみられた(Photo 8B)。しかし好酸性の細胞質を持つ索状型癌には, 全く陽性細胞は認められなかった。腺癌型では結合組織誘導の著明なものは全く陰性で, 結合組織が少なく, 腺管構造をとりながらも充実性に増生している細胞に, ごく少数のAFP産生細胞をみることがあった(Photo 9B)。肝芽腫型でも陽性を示す細胞は, 低分化癌型の特徴をもつ細胞を含んでいる部分だけであった。間葉系細胞は全く陰性であった。

#### 4 考 察

Watabe,<sup>14)</sup> Hirai et al.<sup>15)</sup> の報告にみるように, AFPの出現を指標としてみたアゾ色素の肝癌形成過程は, 次の3期に大別できるようである。すなわち, アゾ色素投与後8週頃までがAFPの一過性に上昇する“一次反応期”であり, その後血中のAFPが低値を示している16週頃までの発癌前期と, その後AFPが急上昇する16週以降の発癌期である。

##### 4.1 AFPの一次反応とoval cell

Watabe が用いた4-dimethylaminoazobenzene 以外のアゾ色素の投与によっても, 一次反応がみられることは, 多くの研究者によっても確かめられているし,<sup>10,16-18)</sup> アゾ色素以外のニトロソ化合物, acetylamino-fluorene (AAF), エチオニンなどでも同様の変化が起ることが知られている。<sup>10-21)</sup> しかし血中のAFPの量は, アゾ色素による場合が最も高い。

Onoé et al.<sup>6)</sup> Dempo et al.<sup>7)</sup> は, 3'-Me-DAB 投与初期の肝組織について, 蛍光抗体法を用いてAFP産生細胞の同定を試み, 胆管上皮に由来するoval cell から肝細胞への分化成熟段階にある移行型細胞および小型肝細胞がAFPを産生することを報告した。この結果は, その後 Uriel et al.<sup>22)</sup> Tchipsysheva et al.<sup>23)</sup> Guillouzo et al.<sup>24)</sup> 佐々木ら<sup>5)</sup> によって支持されている。

最近アゾ色素以外の発癌物質によって肝に増生するoval cell にAFP産生がみられるとの報告が Sell,<sup>25)</sup> Kuhlmann,<sup>26,27)</sup> Shinozuka et al.<sup>20)</sup> によってなされている。一方, これに対して沖田ら<sup>28)</sup> はoval cell にはAFPは認められないと述べており, この点についての意見は必ずしも一致していない。

こうした食い違いが生ずる理由の一つは, oval cell と呼ばれる細胞の性格, ないしそれをとり囲む環境の違いであろう。oval cell という表現はFarber<sup>29)</sup> がエチオニン, AAF, 3'-Me-DAB を投与したラットの肝に出現する増生細胞に対して, その起源におそらく胆管上皮細胞で, 発癌の初期過程で3者に共通してみられる現象として名付けたものである。彼はこの報告の中で, oval cell は3種の発癌物質で同様に増生するが, 3'-Me-DAB の場合だけはoval cell と肝細胞との間に移行があるように見え, この点でPrice et al.<sup>30)</sup> の報告と一致すると述べている。他の2つの発癌物質では移行を示す所見はないという。

oval cell の肝細胞の移行に関してはInaoka<sup>31)</sup> が<sup>3</sup>H-thymidine のとり込みを利用し, oval cell をラベルし, そのラベルが肝細胞に移行することを報告して以来, Iwasaki et al.<sup>10)</sup> による細胞動態の研究, Ogawa et al.<sup>32)</sup> によるマーカー酵素による研究などの結果から, これを支持する所見が得られている。このことに対してStewart,<sup>33)</sup> Bannasch<sup>34)</sup> は疑問を投げかけているが, 有力な反証はあげられておらず, アゾ色素投与初期におけるoval cell の肝細胞への移行については広く受け入れられているものと考えることができる。

一方これに対して, AAF, エチオニン, ニトロソ化合物の投与で増生するoval cell が肝細胞に分化することを示す組織学的な所見は得られていない。oval cell は超微構造的に明らかな胆管上皮細胞としての特徴を備えているが, その中には条件に応じて肝細胞に分化するものと, その傾向を示さないものがあり得ることは, 3'-Me-DAB と alpha-naphthyl-isothiocyanate によるoval cell を比較した水無瀬ら<sup>35)</sup> の報告からも明らかである。他の発癌物質の投与によって増生したoval cell が, アゾ色素の場合と違って肝細胞への分化を示さないものである可能性はありうと思われる。AFPはoval cell という“stem cell”から肝細胞に分化成熟する途上の細胞が, 幼若な肝細胞の機能を一過性に発現して産生するものと考えられるから, 肝細胞への移行を示さないoval cell にAFP産生がみられないのは当然であろう。

##### 4.2 前癌病変とAFP産生について

種々の化学発癌物質を投与すると、その初期に多少とも血中の AFP が上昇し、肝癌形成をみると再び上昇することから、この AFP の上昇と癌化とを関連づける考え方がある。

Kitagawa et al.<sup>17)</sup> は AFP の一次反応が強くでたものでは肝癌の発生率が高いことを報告している。一方、Sell<sup>25)</sup> Shinozuka et al.<sup>20)</sup> は、AAF, エチオニンによる肝癌の発生過程で、初期には oval cell, 後期には“focal zone of atypical hepatocellular hyperplasia”に AFP の産生をみるが、増生巣や増生結節にはそれがみられないことから、前二者も前癌病変であろうと述べている。また Okita et al.<sup>36)</sup> 沖田ら<sup>28)</sup>は、増生結節と肝癌に AFP 産生をみることから、増生結節が前癌病変であるとしている。AFP 産生の場は違っても、Sell, Okita, Shinozuka et al. に共通する考え方は、一度前癌期で発現した形質は、癌化しても発現し続けるということである。この考えにたつと、AFP を産生する“前癌細胞”から AFP 産生性の肝癌が生じ、AFP 非産生性の前癌細胞からは AFP 非産生性肝癌ができるということになる。しかし細胞が癌化の過程で次第に脱分化することはよく知られたことである。<sup>37)</sup> 一方 3'-Me-DAB 投与初期に増生した oval cell は、佐々木ら<sup>9)</sup>が報告しているように、間もなく AFP 産生からアルブミンだけを産生するように分化するのである。このように考えると、AFP 産生という形質の発現一つだけの共通点から、前癌病変と考えて癌と結びつけるのは無理なことであろう。

さらに Okita et al.<sup>36)</sup> 沖田ら<sup>28)</sup>は、AAF で形成される増生結節のあるものに AFP 産生がみられることを述べている。特に Okita et al. の報告では、個々の結節における AFP 産生の有無は“all or none law”に従い、産生のみられる結節では全ての細胞に陽性に染まるとしている。この報告に対しては Tchipsysheva et al.<sup>23)</sup>の反論以来、多くの反論が出されているが、<sup>25-27)</sup> いまだ結論が得られたわけではない。

今回われわれは第 1 群の動物から得られた 639 個に及ぶ増生巣、増生結節について検索したが、そのいずれにも AFP の産生細胞は認められなかった。これは蛍光抗体法間接法の 100 倍から 1,000 倍の感度を有するといわれる PAP 法で検索した第 2 群でも同様であった。以上の結果から、これまでの Okita et al. の報告の結果には疑問を持たざるを得ない。

3'-Me-DAB による発癌期の肝でのもう一つの興味ある所見は、好塩基性増生巣に AFP の産生をみたことである。この増生巣については、Daoust<sup>11)</sup>の詳しい報告

があるが、その名の通り toluidine blue などの塩基性色素に濃染する細胞からなり、<sup>3</sup>H-thymidine のとり込みが肝癌細胞と同様に活発なことから、前癌病変として強調された。また Karasaki<sup>38)</sup>は電顕所見と <sup>3</sup>H-thymidine のとり込みから、この増生巣を構成する細胞は DNA 合成が活発で、形態的にも細胞内小器官に乏しく遊離リボソームが豊富で、癌化に向かう脱分化が生じていると考察している。しかしこの型の増生巣は、必ずしもすべての発癌物質による発癌過程に共通してみられる病変ではないと考えられ、その後はあまり注目されていない。しかしこの病巣は Sell が AAF で認めた atypical hepatocellular hyperplasia に一致するものと思われ、癌化における役割については、今後検討がなされるべきものであろう。

#### 4・3 癌組織と AFP 産生細胞

アゾ色素肝癌の組織学的特徴は非常に多彩で、最大偏倚肝癌ともいうべきものである。Stewart ら<sup>13)</sup>は実験肝癌を基本的に 4 型に分類しているが、アゾ色素ではこれらの 4 型が種々の程度に混在することが多い。この中でも低分化癌型はほとんどの癌結節に認められ、3'-Me-DAB 肝癌の基本型と考えられている。そして AFP 産生細胞はこの部分に多く、細胞質が豊富で好酸性を示す索状型や、腺腔形成をみる腺癌型では AFP 産生細胞は少数であった。この低分化癌の部分には光顕的には癌細胞がシート状に増生しているようにみえるが、電顕的には Fuse et al.<sup>39)</sup> Yoshida et al.<sup>40)</sup> が報告しているように杯細胞や刷子縁の発達した腸上皮化生型がみられたり、胃小窩上皮細胞のような粘液顆粒や、神経内分泌顆粒をもつ細胞がみられ、極めて多彩である。

AFP 産生を cell cycle と関連づけて説明する考えがある。Tsukada and Hirai<sup>41)</sup>はラット腹水肝癌 AH66 を用いて、AFP は G<sub>1</sub> 期の後期から S 期にかけて産生されるとしている。一方 Sell et al.<sup>42)</sup> はラット胎児肝の培養で、AFP は S 期までに合成され、M 期にかけて分泌されるという。一方、Watabe and Hirai<sup>43)</sup>は、多数の腹水肝癌の培養で培養液中の AFP を定量しているが、AFP の非産生株では培養日数に関係なく AFP 産生がみられないという。この培養系では同調培養をしていないので、cell cycle の異った細胞が混在している。従って cell cycle のどこかの時期で AFP を産生するものならば、培養液中の AFP の出現を期待できるはずであるが、結果はそうにはならないようである。以上の結果から AFP の産生は cell cycle だけでなく、その細胞の分化の程度も重要な要因と考えられる。ヒト肝癌でも AFP 陽性になるものは Edmondson 分類の



Grade II~III に多い。すなわち高分化型の Grade I では陰性で、最も低分化型の Grade IV でも陰性である。これも細胞の分化度が AFP 産生と関連することを支持する事実であろう。

## 5 結 論

Wistar 系雄ラットに 0.06% 3'-Me-DAB を投与し、6 週以降肝癌形成に至るまでの肝を経時的に採取し、その組織像と AFP 産生細胞の関連について、組織学的ならびに免疫組織学的検索を行った。

1. 3'-Me-DAB 投与 6~16 週の血清の AFP が低値を示す時期には、前癌病変と考えられている増生巣や増生結節が多数出現したが、AFP 産生細胞は全く認められなかった。しかし塩基性増生巣の一部に AFP 産生が認められた。

2. 16 週以降、高率に肝癌の発生をみたが、AFP 産生細胞は癌の中でも低分化癌型の組織像を示す癌細胞に高頻度に認められた。しかし索状配列をとる分化型索状癌型や腺癌型には少なかった。

このような結果をもとにして、アゾ色素肝癌の発生過程について考察を行った。

## 文 献

1. Abelev, G.I., Perova, S., Khramkova, N., Postnikova, Z., and Irlin, I.: Embryonal  $\alpha$ -globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* **1**, 174-180 (1963).
2. Tatarinov, Ju.: Detection of embryospecific  $\alpha$ -globulin in the blood sera of patient with primary liver tumor. *Vopr. Med. Khim.* **10**, 90-91 (1964).
3. Ruoslahti, E. and Terry, W. D.:  $\alpha$ -Fetoprotein and serum albumin show sequence homology. *Nature* **260**, 804 (1976).
4. Abelev, G. I.: Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.* **14**, 295-358 (1971).
5. 佐々木真由美, 伝法公鷹, 賀来亨, 佐藤昌明, 森道夫: 3'-Me-DAB 発癌過程初期肝におけるアルブミン及び  $\alpha$ -フェトプロテイン産生細胞についての免疫組織化学的研究——肝の個体発生との比較において—— *肝臓* **22**, 254-265 (1981).
6. Onoé, T., Kaneko, A., Dempo, K., Ogawa, K., Minase, T.:  $\alpha$ -Fetoprotein and early histological changes of hepatic tissue in DAB hepatocarcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **259**, 168-180 (1975).
7. Dempo, K., Chisaka, N., Yoshida, Y., Kaneko, A. and Onoé, T.: Immunofluorescent study on  $\alpha$ -fetoprotein-producing cells in the early stage of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. *Cancer Res.* **35**, 1282-1287 (1975).
8. Nakane, P. K., and Pierce, G. B.: Enzyme labelled antibodies: Preparation and application for localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 929-938 (1966).
9. Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Jr, Cuculis J. J., and Meyer, H. G.: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 315-333 (1970).
10. Iwasaki, T., Dempo, K., Kaneko, A. and Onoé, T.: Precancerous changes in rat liver during the early stage of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. I. Fluctuation of various cell populations and their characteristics during azo-dye carcinogenesis. *Gann* **63**, 21-30 (1972).
11. Daoust, R. and Molnar, F.: Cellular populations and mitotic activity in rat liver parenchyma during azo dye carcinogenesis. *Cancer Res.* **24**, 1989-1909 (1964).
12. 小野辺為則, 布施裕輔: アゾ色素肝癌の発生. *細胞* **2**, 25-34 (1970).
13. Committee on Histologic Classification of Laboratory Animal Tumors. Institute of Laboratory Animal Resources. National Cancer Institute: Histologic typing of liver tumors of the rat. *JNCI* **64**, 178-206 (1980).
14. Watabe, H.: Early appearance of embryonic  $\alpha$ -globulin in rat serum during carcinogenesis with 4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **31**, 1192-1194 (1971).
15. Hirai, H., Nishi, S., Watabe, H. and Tsukada, Y.: Some chemical, experimental, and clinical investigations of  $\alpha$ -fetoprotein. *Gann Monograph Cancer Res.* **14**, 19-34 (1973).
16. Kroes, R., Williams, G. M., and Weisburger, J. H.: Early appearance of serum  $\alpha$ -fetoprotein during hepatocarcinogenesis as a function of age of rats and extent of treatment with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **32**, 1526-1532 (1972).
17. Kitagawa, T., Yokochi, T., and Sugano, H.:  $\alpha$ -Fetoprotein and hepatocarcinogenesis in rats fed 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene or N

- 2-fluorenylacetamide. *Int. J. Cancer* **10**, 368-381 (1972).
18. Becker, F. F., Horland, A. A., Shurgin, A. and Sell, S.: A study  $\alpha_1$ -fetoprotein levels during exposure to 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and its analogs. *Cancer Res.* **35**, 1510-1513 (1975).
19. Kroes, R., Williams, G. M., and Weisburger, J. H.: Early appearance of serum  $\alpha$ -fetoprotein as a function of dosage of various hepatocarcinogens. *Cancer Res.* **33**, 613-617 (1973).
20. Shinozuka, H., Lombardi, B., Sell, S., and Iammarino, R. M.: Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. *Cancer Res.* **38**, 1092-1098 (1978).
21. Becker, F. F., and Sell, S.: Differences in serum  $\alpha$ -fetoprotein concentrations during the carcinogenic sequences resulting from exposure to diethylnitrosamine or acetylaminofluorene. *Cancer Res.* **39**, 1437-1442 (1979).
22. Uriel, J., Aussel, C., Bouillon, D., Loisillier, F. and de Nechaud, B.: Liver differentiation and the estrogen binding properties of  $\alpha$ -fetoprotein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **259**, 119-130 (1975).
23. Tchipsysheva, T. A., Guelstein, V. I., and Ban-  
nikov, G. A.:  $\alpha$ -Fetoprotein-containing cells in the early stages of liver carcinogenesis induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and 2-acetylaminofluorene. *Int. J. Cancer* **20**, 388-393 (1977).
24. Guillouzo, A., Belanger, L., Beaumont, C., Valet, J-P., Briggs, R. and Chiu, J-F.: Cellular and subcellular immunolocalization of  $\alpha$ -fetoprotein and albumin in rat liver. Reevaluation of various experimental conditions. *J. Histochem. Cytochem.* **26**, 948-959 (1978).
25. Sell, S.: Distribution of  $\alpha$ -fetoprotein-and albumin containing cells in the livers of Fischer rats fed four cycles of N-2-fluorenylacetamide. *Cancer Res.* **38**, 3107-3113 (1978).
26. Kuhlmann, W. D.: Localization of alpha-feto-  
protein and DNA synthesis in liver cell populations during experimental hepatocarcinogenesis in rats. *Int. J. Cancer* **21**, 368-380 (1978).
27. Kuhlmann, W. D.: Alpha-fetoprotein: Cellular origin of a biological marker in rat liver under various experimental conditions. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* **393**, 9-26 (1981).
28. 沖田 極, 野田健一, 児玉隆浩, 福本陽平, 佐々木まゆみ, 森本哲雄, 松田彰史, 羽田恭一郎, 竹本忠良: 肝発癌過程における  $\alpha$ -フェトプロテイン産生細胞. *肝臓* **36**, 1056-1062 (1979).
29. Farber, E.: Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **16**, 142-148 (1956).
30. Price, J. M., Harman, J. W., Miller, E. C., and Miller, J. A.: Progressive microscopic alterations in the liver of rats fed the hepatic carcinogens 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and 4'-fluoro-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **12**, 192-200 (1952).
31. Inaoka, Y.: Significance of so-called oval cell proliferation during azo-dye hepatocarcinogenesis. *Gann* **58**, 355-366 (1967).
32. Ogawa, K., Minase, T., and Onoé, T.: Demonstration of glucose 6-phosphatase activity in the oval cells of rat liver and the significance of the oval cells in azo dye carcinogenesis. *Cancer Res.* **34**, 3379-3386 (1974).
33. Stewart, H. L.: Comparative aspects of certain cancers. In Becker, F. F. (ed.). *Cancer. A comprehensive treatise.* Vol. 4, pp 303-374, Plenum Press, New York and London; (1975).
34. Bannasch, P.: Cellular and subcellular pathology of liver carcinogenesis. In Remmer, H., Bolt, H. M., Bannasch, P., and Popper, H. (eds.). *Primary liver tumors.* pp. 87-111, MTP Press, Lancaster, (1978).
35. 水無瀬昂, 小川勝洋, 横山繁昭: 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene および alpha-naphthyl-isothiocyanate 投与ラット肝に増生する "oval cell" の組織化学的および電顕的組織化学的研究. *札幌医誌* **44**, 164-183 (1975).
36. Okita, K., Gruenstein, M., Klaiber, M. and Farber, E.: Localization of  $\alpha$ -fetoprotein by immunofluorescence in hyperplastic nodules during hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res.* **34**, 2758-2763 (1974).
37. Uriel J.: Fetal characteristics of cancer. In Becker, F. F. (ed.). *Cancer. A comprehensive treatise*, Vol. 3, pp. 21-55, Plenum Press, New York and London, (1975).
38. Karasaki, S.: The fine structure of proliferating cells in preneoplastic rat livers during azo-dye carcinogenesis. *J. Cell Biol.* **40**, 322-335 (1969).
39. Fuse, Y., Iwasaki, T. and Onoé, T.: Liver tumors induced in rats by 3'-methyl-4-dimethyl-

- aminoazobenzene. III. Electron microscopic investigation — Disdifferentiation of cancer cells. *Tumor Res.* **4**, 1-28 (1969).
40. Yoshida, Y., Kaneko, A., Chisaka, Y. and Onoé, T.: Appearance of intestinal type of tumor cells in hepatoma tissue induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **38**, 2753-2758 (1978).
41. Tsukada, Y. and Hirai, H.:  $\alpha$ -Fetoprotein and albumin synthesis during cell cycle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **259**, 37-44 (1975).
42. Sell, S., Skelly, H., Leffert, H. L., Muller-Eberhard, U. and Kida, S.: Relationship of the biosynthesis of  $\alpha$ -fetoprotein, albumin, hemopexin and haptoglobin to the growth state of fetal rat hepatocyte cultures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **259**, 45-58 (1975).
43. Watabe, H. and Hirai, H.: Production of  $\alpha$ -fetoprotein by transplantable rat hepatoma. *Gann Monograph Cancer Res.* **14**, 279-287 (1973).

---

別刷請求先:

(〒 060) 札幌市中央区南 1 条西 17 丁目

札幌医科大学病理学第 2 講座 伝法公磨

### Explanation of Photographs

- Photo 1 A** Histological appearance of the liver from a rat after 6 weeks of 3'-Me-DAB feeding. The hepatic lobule is mostly occupied by proliferated oval cells, transitional cells and small hepatocytes. Megalocytic hepatocytes are indicated by arrows. (H. E stain,  $\times 110$ ).
- 1 B** Immunohistochemical demonstration of AFP-producing cells in the liver of a rat fed 3'-Me-DAB for 6 weeks. Transitional cells with scanty cytoplasm show a positive reaction for AFP. ( $\times 250$ ).
- Photo 2** Light micrograph from the liver of a rat fed 3'-Me-DAB for 8 weeks. Small hepatocytes with basophilic cytoplasm constitute a hyperplastic focus. (HE,  $\times 110$ )
- Photo. 3** Light micrograph from the liver of a rat fed 3'-Me-DAB for 12 weeks. A hyperplastic nodules is observed on the left. Septal formation by oval cells is indicated by arrows. A pseudo-nodule with one-cell thick-plate is seen on the right. (HE,  $\times 45$ ).
- Photo 4 A** High power view of the area shown in Photo 3. The nodule compresses surrounding non-nodular hepatic tissue. (HE,  $\times 110$ ).
- 4 B** Immunohistochemical preparation of the area shown in Photo 4A. No AFP-positive cells are observed within the nodule. ( $\times 110$ )
- Photo. 5 A** Light micrograph from the liver of a rat fed 3'-Me-DAB for 16 weeks. A hyperbasophilic focus, consisting of small cells with basophilic cytoplasm, is seen in the center of this picture. Megalocytic hepatocytes are seen in the left upper part. (HE,  $\times 270$ ).
- 5 B** Immunohistochemical preparation of the area shown in Photo 5A. AFP is detected exclusively in the cells of the basophilic focus. ( $\times 270$ ).
- Photos 6 to 11** show the cancerous tissues induced in the liver of rats fed 3'-Me-DAB for 18 to 23 weeks.
- Photo 6 A** Light micrograph from a cancerous tissue with a poorly differentiated carcinoma pattern. In the upper part, connective tissue and non-cancerous hepatocytes are seen. (HE,  $\times 110$ ).
- 6 B** Immunohistochemical staining for AFP of the same area shown in Photo 6A. Most tumor cells are positive for AFP. ( $\times 110$ ).
- Photo 7A** High power view of the same area shown in Photo 6A. ( $\times 270$ ).
- 7B** High power view of the same area shown in Photo 6B. Reaction products are variable from cell to cell. ( $\times 270$ ).



- Photo 8 A** Light micrograph from a cancerous tissue with a trabecular carcinoma pattern. Hematopoietic cells are indicated by arrows. (HE,  $\times 110$ ).
- 8 B** Immunohistochemical preparation of the area identical to that shown in Photo 8A. AFP-positive cells are scattered. ( $\times 110$ ).
- Photo 9 A** Light micrograph from a cancerous tissue with an adenocarcinoma pattern. A small amount of connective tissue is observed among the cancer nests. (HE,  $\times 110$ ).
- 9 B** Immunohistochemical preparation of the area identical to that shown in Photo 9A. A very small number of cells are positive for AFP. ( $\times 110$ ).
- Photo 10** Light micrograph of a hepatoblastoma. Epithelial components with glandular structures and primitive connective tissue components are observed. Cartilaginous tissue is seen in the center (arrow). (HE,  $\times 110$ ).
- Photo 11** Light micrograph of a hepatoblastoma. Primitive epithelial cells with scanty cytoplasm sometimes form irregular glandular structures. Note the indistinct border between the epithelial component and the connective tissue component. (HE,  $\times 110$ ).







